

肝癌患者脂肪干细胞重编程为诱导多潜能干细胞

付玉华¹, 范 丽¹, 于 丽¹, 陈 艳², 周秀梅¹, 王 欢¹, 刘 韬², 王敬晗², 李琳芳², 钱其军^{1,2*}

1. 浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究, 杭州 310018

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室, 上海 200438

[摘要] **目的** 重编程肝癌患者来源的脂肪干细胞为诱导多潜能干细胞。**方法** 包装携带 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 基因的反转录病毒, 将病毒感染脂肪干细胞并培养诱导后的细胞, 采用碱性磷酸酶染色、定量 PCR 和原位免疫荧光实验鉴定诱导的克隆样细胞。**结果** 诱导的克隆样细胞表达碱性磷酸酶, 定量 PCR 证实克隆样细胞表达胚胎干细胞多能性基因, 免疫荧光实验证实其表达 Oct4 和 Sox2。**结论** 肝癌患者来源的脂肪干细胞可高效重编程为诱导多潜能干细胞, 且脂肪干细胞可作为培养诱导多潜能干细胞的滋养细胞, 为提高成体细胞重编程效率和建立基于诱导多潜能干细胞的肝癌模型研究提供了平台。

[关键词] 肝肿瘤; 脂肪干细胞; 诱导多潜能干细胞; 重编程; 反转录病毒

[中图分类号] R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0382-05

Reprogramming of adipose-derived stem cells of hepatic cancer patients into pluripotent stem cells

FU Yu-hua¹, FAN Li¹, YU Li¹, CHEN Yan², ZHOU Xiu-mei¹, WANG Huan¹, LIU Tao², WANG Jing-han², LI Lin-fang², QIAN Qi-jun^{1,2*}

1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To reprogram the adipose-derived stem cells of hepatic cancer patients into induced pluripotent stem cells (iPS cells). **Methods** Retrovirus-based pMXs containing Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc were prepared and were used to infect adipose-derived stem cells; the infected cells were then cultured. Alkaline phosphatase staining, quantitative-PCR and immunofluorescence assay were used to identify the ES-cell-like colonies. **Results** The ES-cell-like colonies expressed Alkaline phosphatase. Quantitative-PCR showed that ES-cell-like cells expressed the pluripotency genes of ES cells. Furthermore, immunofluorescence confirmed the expression of Oct4 and Sox2 in ES-cell-like cells. **Conclusion** Adipose-derived stem cells of hepatic cancer patients can be efficiently reprogrammed into iPS cells, and they can serve as the feeder layers of their own iPS cells. These findings may pave a way for improving efficiency of reprogramming adult cells and establishing hepatic cancer model for inducing pluripotent stem cells.

[Key words] liver neoplasms; adipose-derived stem cells; induced pluripotent stem cells; reprogramming; retrovirus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4):382-386]

2006 年, Takahashi 等^[1]通过导入外源性限定因子 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 将小鼠皮肤成纤维细胞重编程为具有胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)特性的多能性干细胞, 又称诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)。2007 年底, 人的成纤维细胞被重编程为 iPS 细胞^[2-3], iPS 细胞的研究与应用避免了 ESCs 在应用上的伦理、免

疫排斥等问题。目前, 基于 iPS 细胞的疾病动物模型^[4-11]和疾病细胞模型^[12-19]及药物发现与评价^[12, 16, 20]等应用已取得突破, 而且 iPS 细胞也为细胞治疗开辟了广阔前景。

脂肪干细胞是一类具有多向分化潜能的间充质干细胞(adipose-derived stem cells, AdSCs)^[21-22], 来源丰富、取材方便。它分化程度低, 可能有助于将其

[收稿日期] 2011-01-13

[接受日期] 2011-02-24

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30925037)。Supported by National Science Foundation for Distinguished Young Scholars(30925037)。

[作者简介] 付玉华, 硕士生。E-mail: fuze2014@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875371, E-mail: qianqj@163.com

重编程为 iPS 细胞。此外,研究证实脂肪干细胞具有向肿瘤迁移的能力,它携带肿瘤“自杀基因”,具抗癌效应,推测脂肪干细胞与癌症的发生发展有密切关系^[23]。因此,研究脂肪干细胞的重编程不仅有助于揭示重编程的高效机制,而且有望建立基于患者脂肪干细胞来源的 iPS 细胞肝癌模型。本研究采用反转录病毒携带重编程因子 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 重编程肝癌患者来源的脂肪干细胞,以期获得能稳定传代的 iPS 细胞。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂 质粒鉴定所使用的限制性内切酶均购自 NEB(New England Biolabs)公司。细胞株 phoneixA 购自 ATCC,质粒 pMXs-hOct4、pMXs-hSox2、pMXs-hKlf4、pMXs-hc-Myc 和 pMXs-EGFP 购自 Addgene。人胚胎干细胞株 hES 由美国南加州大学应其龙教授惠赠,滋养层细胞为本所自行制备的经丝裂霉素 C 预处理的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF 细胞)。KOSR 培养液(100 ml 该培养液的配比为:KO-DMEM 80 ml;KOSR 20 ml;NEAA 非必需氨基酸 1 ml,L-谷氨酰胺 1 ml; β -巯基乙醇 7.0 μ l)。胶原酶 I、DMEM 和 KO-DMEM 均购自 Gibco 公司,polybrene 购自 Sigma 公司,磷酸钙和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色试剂自行配制。小鼠源一抗 Oct4、山羊源一抗 Sox2 和 PE 标记驴抗山羊 IgG 均购自 Santa Cruz 公司;Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自碧云天生物技术有限公司;RT-PCR 试剂盒购自 Tiangen 公司。

1.2 反转录病毒包装 铺 4.0×10^6 phoneixA 于 100 mm 培养皿,用 10% FBS/DMEM 培养至 80%~90%融合程度时,分别用已经鉴定正确的 pMXs-hOct4、pMXs-hSox2、pMXs-hKlf4 和 pMXs-hc-Myc 转染(Eppendorf 管中依次加入 H_2O 、 $CaCl_2$ 、DNA 和 HBS,混匀并室温静置 15 min,逐滴加入上述 100 mm 培养皿,6 h 后,用新鲜培养液代替转染培养液)。48 h 和 72 h 后分别收集培养液上清,1 790 $\times g$ 离心去除细胞碎片,0.45 μm 滤器过滤,病毒入浓缩柱浓缩为 1 ml,并于 $-80^\circ C$ 保存。

1.3 脂肪干细胞分离与生长曲线测定 脂肪组织标本取自东方肝胆外科医院肝癌患者腹腔(获东方肝胆外科医院医学伦理委员会批准),患者年龄 40~50 岁。参考 Zuk 等^[21]分离脂肪干细胞的经典方法,无菌条件下,用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗标本,0.075% I 型胶原酶消化(37 $^\circ C$ 培养箱 30 min),期

间搅拌 2 次,用等体积含血清的 α -MEM 终止消化,滤网过滤,1 200 $\times g$ 离心 5 min,去除漂浮的脂肪细胞及上清液,20% FBS/ α -MEM 培养液重悬细胞,接种至培养皿中,在 37 $^\circ C$ 、5%(体积分数)CO₂ 培养箱中孵育,48 h 后首次换液(用生理盐水洗 2~3 次,弃去未贴壁细胞),细胞生长至 80%~90%融合时传代,每 2~3 d 更换培养液。

取生长状况良好的第 2、第 4、第 8 代细胞,胰酶消化后按 2.5×10^4 /孔(6 孔板)种植(计为第 0 天)。在 37 $^\circ C$ 、5%(体积分数)CO₂ 培养箱中培养,每天在固定时间消化 3 个孔并计算 3 个孔细胞数,连续测定 8 d,未测定组每隔 3 d 换液。以时间(d)为横坐标,每天测定 3 个孔细胞数的平均值为纵坐标,绘制生长曲线,计算细胞群体倍增时间。

1.4 病毒感染脂肪干细胞和克隆获得 将生长良好的第 3 代细胞以 2.5×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板(计为第 0 天),5%(体积分数)CO₂、37 $^\circ C$ 孵箱培养。第 1 天去除原培养液,病毒(pMXs-hOct4、pMXs-hSox2、pMXs-hKlf4、pMXs-hc-Myc)等量(0.5 ml)混合并加 Polybrene 2.5 μ l(终浓度 8 ng/ml)充分混匀,加入上述孔板,5%(体积分数)CO₂、37 $^\circ C$ 孵箱培养。每 12 h 更换为新病毒液,连续感染 3 次,继续培养。消化被感染的脂肪干细胞,按 1:3 的比例接种于铺有滋养层细胞的孔板(0.1%的明胶包被),KOSR 培养液培养并换液。在显微镜下,用无菌玻璃管挑取单克隆种植于铺有滋养层包被的孔板培养,长到合适密度,传代于 24 孔板并进行滋养层培养和无滋养层培养。

1.5 碱性磷酸酶染色 经过 10 d 左右的病毒感染,出现微小克隆样细胞。微小克隆细胞培养一段时间后吸出培养液,PBS 洗涤 2 次;室温,4%多聚甲醛(PFA)固定 15 min;去除孔板固定液,用 PBS 洗细胞 3 次,每次 5 min;向 24 孔板每孔加入 0.5 ml 染色液(Fast-Red: α -萘酚:Tris-base=5:1:4),避光室温孵育 15 min;吸出染色液,用 PBS 洗细胞 3 次,每次 5 min,观察细胞着色情况。

1.6 RT-PCR 检测克隆细胞基因表达 (1)RNA 抽提:将获得的 2 株胚胎干细胞样细胞 hiPSC₁、hiPSC₂ 和对照细胞 hES、AdSC,在细胞长到合适融合度时准备提取细胞 RNA,手工法抽提总 RNA,测浓度后于 $-70^\circ C$ 保存。(2)第一链 cDNA 合成:采用 Quant-script RT Kit Quant cDNA 第一链合成试剂盒将所提取的 mRNA 反转录为 cDNA。(3)定量 PCR(qRT-PCR):依据文献设计 RT-PCR 引物(表 1),由 Invitro-

gen 公司合成,使用前配制成 10 μ mol/L。

表 1 RT-PCR 引物序列
Tab 1 Sequence of RT-PCR primers

Primer	Sequence(5'-3')
hOct4-R	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AG
hOct4-F	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC
hSox2-R	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG
hSox2-F	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG
hKlf4-R	ACG ATC GTG GCC CCG GAA AAG GAC C
hKlf4-F	TGA TTG TAG TGC TTT CTG GCT GGG CTC C
hc-Myc-R	GCG TCC TGG GAA GGG AGA TCC GGA GC
hc-Myc-F	TTG AGG GGC ATC GTC GCG GGA GGC TG
hNanog-R	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC
hNanog-F	GAT GGG AGG AGG GGA GAG GA
GAPDH-R	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC
GAPDH-F	AGG GAT CTC GCT CCT GGA A

1.7 免疫荧光检测 Oct4、Sox2 基因的表达 吸去待测克隆细胞和未经病毒感染脂肪干细胞的培养液,用 PBS 洗 3 次;用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min;去除多聚甲醛,PBS 洗 3 次,每次 5 min;以 0.1% Triton X-100(含 0.3% BSA)穿透 40 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;在室温下用特异性一抗(1:200)孵育 1 h,吸去一抗,PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入二抗(1:500);PBS 漂洗细胞 3 次,每次 5 min,荧光显微镜下观察结果。

2 结 果

2.1 脂肪干细胞的培养与生长曲线 从脂肪组织分离的原代脂肪干细胞(图 1A)培养 24 h 后,倒置相差显微镜即可观察到有短梭形有核细胞贴壁生长,贴附在孔板底部,形似成纤维细胞。第 2、第 4、第 8 代细胞体外培养的生长曲线见图 1B,从生长曲线图可知,这 3 代的传代培养具有以下共同的特征:传代培养的潜伏期约为 24~36 h,传代培养细胞的对数增殖期为 6 d,接种后第 7 天进入平台期。在细胞生长的对数期,脂肪干细胞的倍增时间约为 38 h。脂肪干细胞成体干细胞体外扩增能力强,并表现出低衰老水平。

2.2 病毒感染脂肪干细胞与克隆细胞获得 用重编程因子 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 诱导脂肪干细胞,发现脂肪干细胞在诱导 6~8 d 后发生形态变化,并在第 13 天左右形成明显的类似人胚胎干细胞的克隆样生长。在诱导的 3 个孔(6 孔板)中根据克隆形态鉴定出 97 个人胚胎干细胞样克隆(图 2),重编程效率约为 0.013%。挑取单克隆培养传代,在有滋养层和无滋养层条件下均能生长。

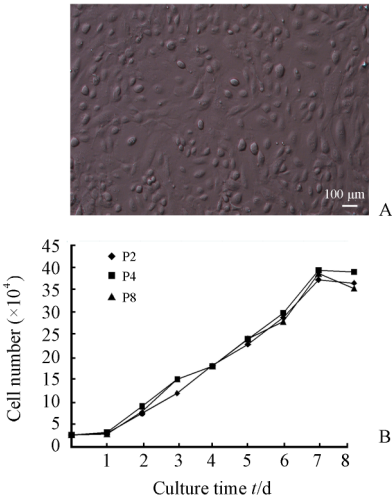


图 1 原代脂肪干细胞的形态(A)及脂肪干细胞的生长曲线(B)
Fig 1 Primary adipose-derived stem cells (A) and cell growth curve of adipose-derived stem cells (B)

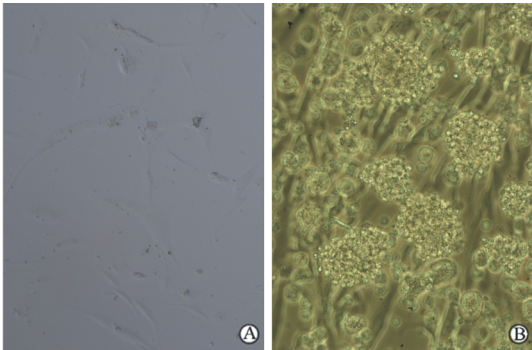


图 2 未进行病毒诱导的脂肪干细胞(A)和病毒诱导脂肪干细胞形成的类胚胎干细胞样克隆(B)
Fig 2 Morphologies of normal adipose-derived stem cells (A) and ES-like colonies of retrovirus infected adipose-derived stem cells (B)

2.3 碱性磷酸酶染色结果 碱性磷酸酶在早期胚胎干细胞中有较高表达,而在已分化的细胞中活性明显降低,甚至不表达,碱性磷酸酶的表达是一种 ES 细胞及相关多潜能干细胞的特征。将诱导出的克隆样细胞进行碱性磷酸酶染色,结果呈不均一的阳性(图 3),而未诱导的脂肪干细胞碱性磷酸酶染色呈阴性。表明脂肪干细胞来源的胚胎干细胞克隆样细胞具有多能干细胞的特征。

2.4 RT-PCR 检测克隆细胞基因表达 利用 RT-PCR 检测诱导后细胞内源 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 和 Nanog 表达情况,以 hES 细胞为阳性对照,未诱导的脂肪干细胞为阴性对照。结果表明,未诱导的脂肪干细胞只表达 Klf4、c-Myc,反转录病毒诱导的脂肪干细胞同 ES 细胞一样表达 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 和 Nanog 等多能性基因(图 4)。

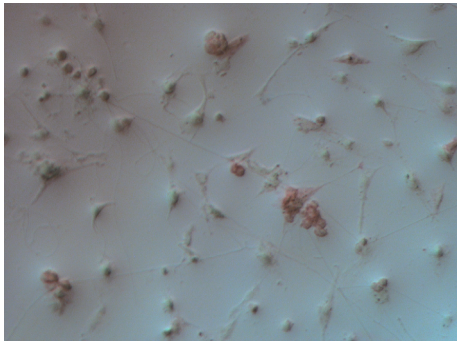


图 3 病毒感染脂肪干细胞表达碱性磷酸酶
Fig 3 Retrovirus infected adipose-derived stem cells expressing AP

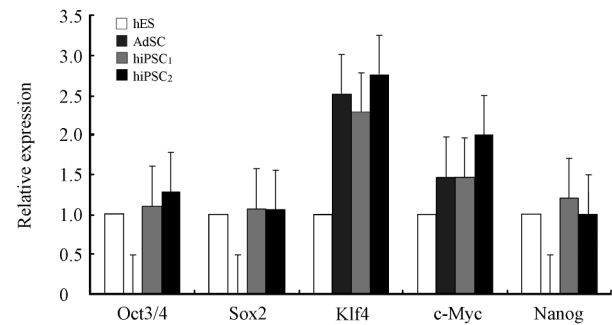


图 4 实时定量 PCR 检测 ES 细胞样克隆细胞基因表达
Fig 4 Quantitative-PCR analysis of pluripotency gene expression levels in ES-like colonies
 $n=3, \bar{x} \pm s$

2.5 免疫荧光检测 Oct4、Sox2 基因的表达结果 为进一步鉴定诱导后的脂肪干细胞的多潜能性,通过免疫荧光试验检测多能性关键基因 Oct4、Sox2 的表达情况。结果表明经反转录病毒感染的脂肪干细胞 Oct4 和 Sox2 的免疫荧光染色呈强阳性(图 5)。

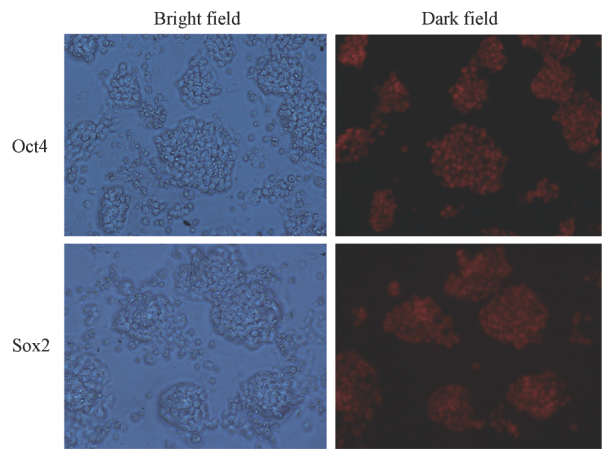


图 5 克隆细胞 Oct4 和 Sox2 免疫荧光
Fig 5 Immunofluorescence of cell colonies with Oct4 and Sox2
Original magnification: $\times 200$

3 讨论

重编程的分子机制尚不明确,导致细胞重编程效率低下和 iPS 细胞应用受限。本研究采用磷酸钙作为转染试剂,phoneixA 细胞作为包装细胞,包装出携带单个转录因子的反转录病毒。与传统方法相比,单质粒包装系统不需额外的包装质粒,这能减少导致宿主细胞基因突变和基因功能失调的风险,有助于获取高纯合度的 iPS 细胞,携带单基因的反转录病毒也有利于研究各个转录因子在诱导重编程中的作用和阐明重编程的分子机制。在细胞克隆的筛选上,本研究采用了从重编程后细胞形态学来筛选而非基于病毒载体的药物抗性筛选和标记基因筛选,这比传统的基于 Fbx-15^[1]、Nanog^[24]、Oct4^[25] 的筛选方法更安全,所获取的 iPS 细胞更具有临床应用价值。

脂肪干细胞是一个具多向分化潜能的间充质干细胞^[20-21],取材方便、安全且可大量获取,是制备患者特异 iPS 细胞的源泉。笔者按照经典的脂肪组织干细胞分离方法^[21],大量培养并获取脂肪干细胞。通过对脂肪干细胞生长曲线的分析,选择处于对数生长期的脂肪干细胞进行重编程,有助于克服细胞重编程的衰老障碍^[26]。从供体年龄来看,我们选择年龄相对小的肝癌患者(40~50 岁)的脂肪干细胞用于重编程,获得了较好的结果。尽管我们按照传统的方法分离出大量脂肪干细胞,但是脂肪干细胞多含有血液细胞、成纤维细胞、淋巴细胞等杂细胞,且目前还没有确定的分选标准,这给重编程细胞和重编程后的 iPS 细胞带来很大异质性,因此需要进一步改进方法,以期获得更纯的脂肪干细胞。

反转录病毒感染的脂肪干细胞经过培养、传代、挑克隆,种植于明胶包被滋养层细胞的孔板中继续培养,重编程效率约为 0.013%。此外,在无滋养层的条件下,用脂肪干细胞充当滋养层,脂肪干细胞来源的 iPS 细胞能够成活,这表明脂肪干细胞能够分泌滋养层细胞分泌的细胞因子。在本研究中,鉴定脂肪干细胞来源的 iPS 细胞的碱性磷酸酶染色为阳性,初步表明被反转录病毒感染后的细胞具有多能性。笔者将建立的 iPS 细胞进行 RT-PCR 和免疫荧光鉴定,RT-PCR 鉴定发现 iPS 细胞表达 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 和 Nanog,进一步免疫荧光试验发现,Oct4 和 Sox2 呈现强阳性。因此,基于上述可初步确定脂肪干细胞来源的胚胎干细胞样克隆为 iPS 细胞。按照人 iPS 细胞的鉴定标准^[27-28],有待进一步做畸胎瘤试验,证实脂肪干细胞来源的 iPS 细胞能否分化为 3 个胚层来源的细胞。本研究为提高

成体细胞重编程效率和建立基于 iPS 细胞的肝癌模型研究提供了平台。

[参考文献]

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126: 663-676.
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [3] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane J L, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318: 1917-1920.
- [4] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun C W, Meissner A, Casasady J P, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin [J]. *Science*, 2007, 318: 1920-1923.
- [5] Wernig M, Zhao J P, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 5856-5861.
- [6] Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, et al. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 2610-2618.
- [7] Xu D, Alipio Z, Fink L M, Adcock D M, Yang J, Ward D C, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 808-813.
- [8] Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 12704-12709.
- [9] Meng X L, Shen J S, Kawagoe S, Ohashi T, Brady R O, Eto Y. Induced pluripotent stem cells derived from mouse models of lysosomal storage disorders[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 7886-7891.
- [10] Alipio Z, Liao W, Roemer E J, Waner M, Fink L M, Ward D C, et al. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 13426-13431.
- [11] 付玉华, 周秀梅, 徐凤青, 钱其军. 诱导多潜能干细胞(iPSCs)的研究与应用进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38: 101-112.
- [12] Ebert A D, Yu J, Rose F F Jr, Mattis V B, Lorton C L, Thomson J A, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient[J]. *Nature*, 2009, 457: 277-280.
- [13] Dimos J T, Rodolfa K T, Niakan K K, Weisenthal L M, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons[J]. *Science*, 2008, 321: 1218-1221.
- [14] Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza S L, Ang Y S, Schaniel C, Lee D F, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome[J]. *Nature*, 2010, 465: 808-812.
- [15] Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 15768-15773.
- [16] Lee G, Papapetrou E P, Kim H, Chambers S M, Tomishima M J, Fasano C A, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs[J]. *Nature*, 2009, 461: 402-406.
- [17] Park I H, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2008, 134: 877-886.
- [18] Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowey S, Williams D M, Jang Y Y, et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders[J]. *Blood*, 2009, 114: 5473-5480.
- [19] Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenachea G, Vassena R, Navarro S, Barrero M J, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2009, 460: 53-59.
- [20] Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D A, Huang J I, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 4279-4295.
- [21] Guilak F, Lott K E, Awad H A, Cao Q, Hicok K C, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 6: 229-237.
- [22] Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, Maeda S, Yoshida M, Maejima H, et al. Evaluation of antiangiogenic activity of azu-mamides by the *in vitro* vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 2982-2984.
- [23] Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy[J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 6304-6313.
- [24] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448: 313-317.
- [25] Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state[J]. *Nature*, 2007, 448: 318-324.
- [26] Esteban M A, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 6: 71-79.
- [27] Rowland B D, Peeper D S, KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 11-23.
- [28] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1: 39-49.